

BIOETHERAPY OF CANCER BY TARGETING TP-3/p80

Publication number: JP10508868 (T)

Publication date: 1998-09-02

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- **international:** **A61K47/48; A61P35/00; A61K47/48; A61P35/00;** (IPC1-7): A61K47/48

- **European:** A61K47/48T2C12P2F

Application number: JP19960521737T 19960111

Priority number(s): WO1996US00104 19960111; US19950372608 19950113

Also published as:

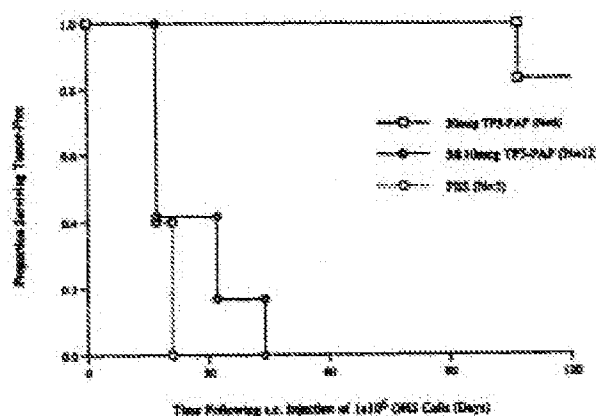
WO9621467 (A1)
US6042829 (A)
US5690935 (A)
EP0802799 (A1)
CA2209767 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 10508868 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9621467 (A1)**

Cytotoxic biotherapeutic agents effective for treating certain types of cancer in humans are provided which comprise the TP-3 murine monoclonal antibody chemically conjugated to pokeweed antiviral protein (PAP). The invention further provides a method which utilizes the disclosed cytotoxic biotherapeutic agents to systemically treat cancer patients. With slight modifications the method of the present invention should be generally applicable to preparation and use of other cytotoxic biotherapeutic agents using chemical or recombinant derivatives of the TP-3 or TP-1 antibodies or PAP toxin. The invention is applicable to cancer patients who express the p80 antigen recognized by the TP-1/TP-3 antibodies either on the surface of their tumor cells or on the tumor blood vessels.



Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(51)Int.Cl.⁵
A 6 1 K 47/48

識別記号

F I
A 6 1 K 47/48

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21)出願番号 特願平8-521737
 (86) (22)出願日 平成8年(1996) 1月11日
 (85)翻訳文提出日 平成9年(1997) 7月11日
 (86)国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 0 0 1 0 4
 (87)国際公開番号 W O 9 6 / 2 1 4 6 7
 (87)国際公開日 平成8年(1996) 7月18日
 (31)優先権主張番号 0 8 / 3 7 2 , 6 0 8
 (32)優先日 1995年1月13日
 (33)優先権主張国 米国 (U S)

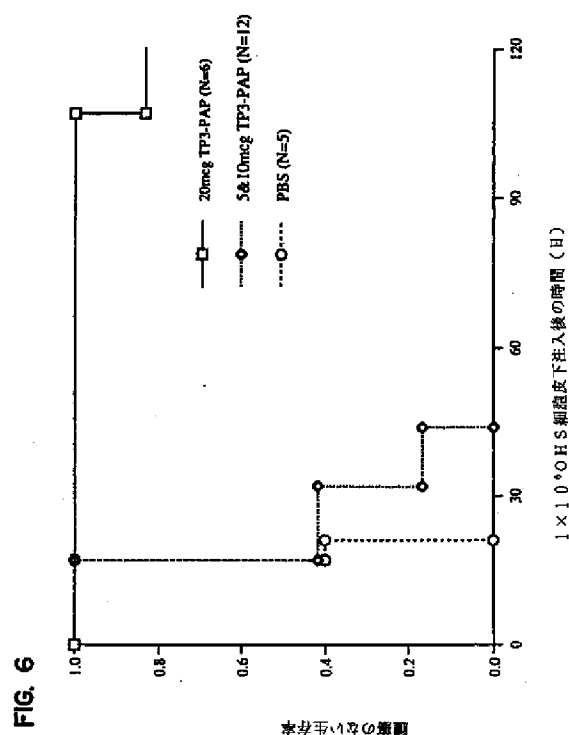
(71)出願人 リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシテ
ィ・オブ・ミネソタ
アメリカ合衆国55455ミネソタ州ミネアポリス、チャーチ・ストリート・サウスイースト100番 モリル・ホール
 (72)発明者 アックン, ファティー・エム
アメリカ合衆国55110ミネソタ州ホワイト・ベア・レイク、イーサン・アベニュー・ノース12590番
 (74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 TP-3/p80を標的とする癌の生物療法

(57)【要約】

ヒトのある種の癌を処置するのに効果的な細胞障害性生物療法剤が提供され、それはアメリカヤマゴボウ抗ウイルス・タンパク質 (PAP) に化学的にコンジュゲートしたTP-3 ネズミ・モノクローナル抗体を含む。少し修飾することにより、本発明の方法は、TP-3またTP-1抗体あるいはPAP毒素を用いて、他の細胞障害性生物療法剤の製造および使用に、一般的に適用される。本発明は、腫瘍細胞の表面または腫瘍血管のいずれかでTP-1/TP-3抗体により認識されるp80抗原を発現する患者に用いられ得る。



【特許請求の範囲】

1. p 80骨肉腫に対する担体と結合したアメリカヤマゴボウ抗ウイルス・タンパク質の細胞障害性有効量を含む生物療法剤。
2. 担体が抗体または抗体断片である、請求項 1 の生物療法剤。
3. 抗体が T P-1、T P-3またはその誘導体である、請求項 2 の生物療法剤。
4. アメリカヤマゴボウが化学的架橋結合により抗体と結合している、請求項 3 の生物療法剤。
5. アメリカヤマゴボウの1-3分子が抗体の各分子と結合している、請求項 2 の生物療法剤。
6. p 80抗原を発現する癌患者に、p 80抗原に対する担体に結合したアメリカヤマゴボウ抗ウイルス・タンパク質の細胞障害性有効量を含有する生物療法剤の治療的有效量を非経口的に投与することを含む癌の処置のための治療方法。
7. 癌が肉腫である、請求項 6 の方法。
8. 肉腫が骨肉腫である、請求項 7 の方法。
9. 生物療法剤が薬学的に許容される液体担体と併用して投与される、請求項 6 の方法。
10. 液体担体が等張塩類を含む、請求項 9 の製法。
11. 生物療法剤が静脈に投与される、請求項 9 の方法。
12. 担体が抗体または抗体断片である、請求項 6 の方法。
13. 抗体が T P-1、T P-3またはその誘導体である、請求項 12 の方法。
14. 抗体が T P-3またはその活性サブユニットである、請求項 13 の方法。
15. P A P の1-3分子が T P-3の各分子に結合している、請求項 14 の方法。
16. T P-3-P A P量は約1-7日を越えて投与される0.025-1mg/kgである、請求項 14 の方法。
17. 生物療法剤の投与に抗腫瘍薬の有効量の非経口投与を伴う、請求項 6 の方法。

18. 抗腫瘍薬がドキソルビシン、メトトレキサート、エトポシド、アルキル

化剤またはプラチナ化合物からなる群より選ばれる、請求項 17 の方法。

19. 抗腫瘍薬が薬学的に許容される担体と結合している、請求項 18 の方法

。

【発明の詳細な説明】

TP-3/p80を標的とする癌の生物療法

発明の背景

骨肉腫

中胚葉由来の悪性腫瘍である肉腫は、主に骨および柔組織で発達する。McClay 等著、『骨および柔組織の肉腫の処置に関する免疫療法的な試み』、Seminars in Oncology、16, 328(1989)。また、これらの組織は成人ヒト体重の60%以上を占めている。McClay 著、『骨および柔組織の肉腫の疫学』、Seminars in Oncology、16, 264(1989)。しかし、この組織での悪性腫瘍が減退することはまれである。1994年には新しいケースの骨肉腫2000件と新しいケースの柔組織の肉腫6000件が存在したと推測されている。American Cancer Society: Cancer Facts and Figures-1994、ニューヨーク、American Cancer Society、1994、p.6。またそれらはアメリカ合衆国で診断された全ての癌の約0.8%を占めている。

これらの肉腫は一般的ではないが、これらの腫瘍をもつかなり多くの患者が転移性疾病が原因で死亡している。事実、1972年以前は転移性骨原性肉腫の症状をもつ患者の致死率は100%であった。Frei 等著、『骨原性肉腫：治療的処置の発展』：Frontiers of Osteosarcoma Research、Novak 等著、Hogrefe および Huber 監修、pp.5-13(1993)。転移疾病のない患者は、その大半が原発性腫瘍を処置するために切断手術を必要としており、また切断したにもかかわらず80%で再発し、主に肺転移が原因で死亡する。Bruland 等著、『放射免疫検出法および放射免疫治療：骨原性肉腫の治療技術における有益な試み？』、Frontiers of Osteosarcoma Research、Novak 等著、Hogrefe および Huber 監修、pp.149-159(1993)。

アジュバント化学療法により再発することのない、また完全な生存は、実質的に増加している。しかしながら、ここ20年間の間で、骨原性肉腫をもつ患者の処置において、大量のメトトレキサート、ドキソルビシンおよび例えばシクロホ

スファミド、イホスファミドおよびシスプラチンのようなアルキル化剤を含む治療法を用いて、かなりの進展がみられたにもかかわらず、これらの患者の40%がまだこの疾病で死亡している。Ward 等著、『第II B 段階の四肢骨肉腫の転移性肺

腫瘍および続発性転移性肺腫瘍』、Journal of Clinical Oncology, 12, 1849(1994)。第一選択薬で処置した後に化学療法耐性腫瘍細胞が再成長し、骨肉腫が再発した患者に積極的に第二選択薬の化学療法を用いても二義的な効果しか得られないようである。

従って、骨肉腫をもつ患者には疾病の早期発見および、化学療法剤耐性疾病の除去が必要である。上記したように、アジュバント化学療法はユーイング肉腫、横紋筋肉腫および骨肉腫を含めた数多くの肉腫に対する標準的な処置法である。Balis等著、『化学療法の一般原理』、小児腫瘍学の原理と診療、第2版、Pizzo等著、J.B.Lippincott Company監修、フィラデルフィア、pp.197-245(1993)。しかしながら、診断時に転移性疾病を伴うものまたは肺転移進行後の成人柔組織肉腫および骨肉腫において化学療法の有意義な利点を見い出すことはより困難である。Elias等著、『柔組織肉腫のアジュバント化学療法：効果的な養生法の探索の試み』、Seminars in Oncology, 16, 305(1989)；Meyers等著、『初期の症状における臨床的に検知可能な骨原性肉腫』、J. of Clinical Oncology, 11, 449(1993)。

薬物ターゲティングは正常組織を損傷せず悪性腫瘍細胞を殺滅する将来性のある新しい試みである。薬物ターゲティングにおける躍進はハイブリドーマ技術の出現であり、これはモノクローナル抗体 (MoAb) を臨床に適用するというものである。腫瘍細胞の特定の個体群に選択性をもつ薬剤を構築するために、MoAb またはその他の細胞標的タンパク質を細胞障害性薬剤と結合させて生物療法剤と呼ばれる分子を形成し、これはすなわち担体部分 (例えばMoAb) の選択性に細胞毒性効力を付与したものとなる。担体部分は、酵素または蛍光標識した抗体との反応で決められた悪性腫瘍細胞の表面抗原プロファイルに基づき選択し得る。

過去十年間、様々な種類の癌の処置のために生物療法が研究されており、より

近年には、慢性関節リウマチおよび後天性免疫不全症候群 (AIDS) のような免疫学的疾病の処置のため生物療法の研究が行われている。これらの薬剤は、特定のヒト病理に対する安全かつ効果的な治療法を提供する可能性があることが分

かっているけれども、まだ多くの難問が残っている。理想的には、標的細胞上に常時存在する信頼し得る標識があれば、生物療法剤の結合部位が非標的組織に結合するのを完全に防げるだろう。現実的には、生命維持に絶対必要な器官により発現された抗体との間で交差反応を起こすためにin vivoの適用においてしばしば許容できない合併症を引き起こす。疾病が進行する過程で患者はすでに免疫反応が抑制されているかもしれないけれども、生物療法剤（特に天然ヒトタンパク質でない場合）の分離成分に対して免疫応答を示す可能性もある。さらに、患者が耐え得る用量には限界があることから、in vitroの研究で得られた細胞障害性を、臨床に応用するには限界がある。さらに、固形腫瘍は完全に浸透するのが難しく、結果として再発の原因となり得る疾病を残してしまう可能性がある。最後に、肉腫の希少性および不均一性のために、これらの癌に対する生物療法剤の開発が困難となっている。McClay、E. F.、『骨および柔組織の肉腫の疫学』、Seminars in Oncology, 16, 264(1989)、McClay等著、『骨および柔組織の肉腫の処置に対する免疫療法的試み』、Seminars in Oncology, 16, 328(1989)。

このように、肉腫で苦しむ患者に新しい処置法を開発することが強く必要とされている。新アジュバント化学療法による骨肉腫の壊死度合が、疾病を伴わず生存するかどうかの非常に有意な指標となることが示されているため、新アジュバント化学療法にあまり反応を示さない患者または転移疾病をもつ患者に対する新規な処置法の開発ならびに新アジュバント化学療法に対して好ましい初期反応を示す骨肉腫患者の割合を増加させることが必要である。Raymond等著、『骨肉腫化学療法効果：予後の因子』、Seminars in Diagnostic Pathology, 4, 212(1987)；Winkler等著、『骨肉腫の新アジュバント化学療法：組織学的腫瘍応答に基づくサルベージ化学療法を用いた無作為的協同試験（COSS-82）の結果』、J. of Clinical Oncology, 6, 329(1988)。

発明の要約

本発明は、担体、好ましくはp 80細胞表面レセプターに結合する抗体または抗体断片に結合している毒素、好ましくはアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）からなる、細胞障害性生物療法剤に関するものである。p 80抗原は

、骨肉腫または柔組織肉腫のような癌の腫瘍血管ならびに腫瘍細胞と関係する。該生物療法剤の毒素部分は、抗体特異性の細胞表面レセプターを発現しない周辺の正常組織に対する有意な非特異的細胞毒性なしに(すなわち副作用が無害である)、標的腫瘍細胞の分裂を阻害したりまたは殺滅する。さらに、生物療法剤は個々の腫瘍細胞に対して細胞障害性を現し、直接的に標的腫瘍を殺滅するだけでなく、腫瘍に酸素や栄養物を運搬する血管を殺滅し間接的にも標的腫瘍を殺滅する。異種移植したヒト骨肉腫の急速な壊死がSCIDマウスモデルで観察された。最も重要なことに、ヒト骨肉腫を用いて異種移植したSCIDマウスの寿命は、TP-3-PAPで処置すると著しく改善され、これは腫瘍発育をこの生物療法剤が阻害したためである。PAP単独またTP-3単独のいずれも、非常に高濃度においても腫瘍細胞成長を阻害しなかったため、本発明の生物療法剤が示す細胞障害性は予期できない効力があつた。

本発明は、部分的にはTP-1およびTP-3モノクローナル抗体により認識されるp80抗原が肉腫に明らかに独特なものであり、さらに、TP-1/TP-3抗原の分布は正常細胞上では数が極めて限定されているという発見に基づいている。このように、本発明の好ましい態様は、肉腫細胞上のレセプターに特異的に結合するモノクローナル抗体または抗体断片といった担体に結合している、細胞障害性量のPAP分子からなる。このように、好ましい担体は、TP-1およびTP-3ならびにTP-3の活性断片であるFabまたはFab₂、および標的抗原を認識する組換え抗体であるTP-1またはTP-3の単鎖FV(scFV)である。最も好ましくは、使用する担体がTP-3であるかまたはその活性断片Fab、Fab₂またはscFVである。PAPおよび好ましい担体とのコンジュゲートにより生じる生物療法剤は意図するTP-3-PAPとなり得る。ここで使用しているように、用語『担体』は抗体、抗体断片およびそのサブユニットを含むものであり、これらは結合特異性においては少なくとも等価である。ここでPAPに関

して使用しているように、『細胞障害性量』は、少なくとも一つのPAP、すなわち、1-3分子のPAPが各抗体分子に結合していることを意味している。

本発明は、また標的癌の処置に対する治療法にも関するものである。本方法は

標的癌で苦しむ患者に、有効細胞障害性量のPAPに共有結合的に結合しているモノクローナル抗体TP-3を構成成分とする生物療法剤からなる医薬組成物の有効量を、薬学的に許容できる担体との組み合わせで非経口的に投与することを含む。ここで使用しているように、用語『標的癌』はTP-1およびTP-3により認識される抗原すなわちp80抗原を発現するホ乳動物細胞の増殖に関連した疾病を意味する。p80抗原は標的癌の腫瘍血管または腫瘍細胞自身のいずれかに発現し得る。このような標的癌は、以下に限定されることはないが、骨肉腫、血管外皮細胞腫、軟骨肉腫、悪性腫瘍繊維性組織球種(MFH)、カボジ肉腫、繊維肉腫および滑膜細胞肉腫を含むその他のヒト肉腫を含む。ここで使用しているように、用語『PAP』はサブタイプであるPAP-IIおよびPAP-Sを含めた、あらゆる細胞障害性アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質またはその誘導体を意味する。この免疫毒素の示す高い細胞障害作用は予期していないものであった。というのもPAPまたはTP-3だけでは当量またはそれ以上の濃度でも細胞障害性が見られなかったからである。さらに、TP-3-PAPは、白血病関連の抗原(例えばB43-PAP)に対するPAP免疫コンジュゲートよりもはるかに効力があることが発見された。

さらに、p80抗原は様々な種類の癌および骨肉腫の出芽毛細血管上に存在しているので、TP-3-PAPのようなp80指向の、生物療法剤は、選択的に癌細胞を破壊するだけでなく腫瘍の血管内皮細胞をも破壊することにより、肉腫の成長を阻害し得る。1ミリ以上の大きさの腫瘍はいずれも新生血管が同様に成長することを必要とするので、そのような新生血管の破壊は究極的には腫瘍の死につながる。Folkman等著、Biologic Therapy of Cancer、DeVita等著、J.B.Lippincott Company監修、pp.743-753(1991)。さらに、そのような破壊は抗腫瘍薬が腫瘍の固形組織に侵入するのを容易にし得る。他の言葉でいえば、腫瘍血管の破壊に加えて、TP-3-PAP生物療法剤は、抗腫瘍薬が腫瘍に侵入し得る腫瘍血

管の障害部位または『窓』を提供することで抗腫瘍薬の侵入を助け得る。

このように、本発明のさらなる態様は1つ以上の慣用的な抗腫瘍薬の有効量の投与を伴う生物療法剤の投与を含む。好ましくは、用いる抗腫瘍薬はドキソルビ

シン、メトトレキセート、エトポシドおよび、オキシアザホスホリン(シクロホスファミドおよびイホスファミド)のようなアルキル化剤、およびシスプラチンおよびカルボプラチンのようなプラチナ化合物である。

図の簡単な説明

図1A、1Bおよび1CはTP-3-PAPの精製および同定を示している。具体的には、図 1Aは、HPLC溶出クロマトグラムであり、38分にTP-3-PAPの溶出が、56分に遊離のPAPの溶出がみられる。図 1Bは、TP-3およびTP-3-PAPのクーマシーブルー染色ゲルであり、図 1Cは、抗-PAPを用いて行ったウエスタンブロットである。

図 2Aおよび2Bは、³Hチミジン取り込み解析により決定した、TP-3MoAb、PAPおよびTP-3-PAP免疫毒素で処理後のヒトOHS骨肉腫細胞の増殖を図示したものである。具体的には、図 2Aでは、TP-3MoAbではなくTP-3-PAPのみがOHS細胞の成長を阻害したが、一方、図 2Bでは、TP-3結合部分が低濃度でOHS細胞に対するPAP毒素効果をもたらすのに必要であったことが示されている。CD19陰性OHS細胞に結合しない抗-CD19-PAP免疫毒素であるB-43-PAPは非常に高い濃度(>1000 pM)でも小さな効果しかなかった。

図 3Aおよび3Bは、TP-3陰性細胞系でのTP-3-PAPの効果を示している。具体的には、図 3Aは、犬D17骨肉腫の培養に対するヒト血清アルブミン(HSA)、TP-3MoAb、TP-3-PAP免疫毒素またはB43-PAP免疫毒素の効果を示している。図 3Bは、CD19+RS4;11ヒト急性リンパ性白血病におけるHSA、TP-3MoAb、TP-3-PAPおよびB43-PAPの効果を図示している。

図4はMCA106肉腫肺転移に対するTP-3-PAP免疫毒素の用量反応を図示している棒グラフである。

図5は、C. B. -17-SCIDマウスの右後方の足に注射後の皮下OHS (ヒト骨肉腫) の腫瘍容積に対するTP-3-PAPの効果を示している。

図6は皮下のヒト骨肉腫 (OHS) を注射し、続いてPBSまたはTP-3-PAP

Pのいずれかで処理し、腫瘍を残すことなく助かったマウスの生存率を図示している。

発明の詳細な説明

免疫毒素

免疫毒素（抗体－毒素コンジュゲート）は、比較的新しい部類の生物療法剤であり、細胞型特異的ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を、数多くある触媒酵素の1つと共有結合で直接にまたは結合剤を介して、共有結合的に結合させて調製する。Pastan等著、『免疫毒素』、Cell, 47, 641(1986)。下記するように、肉腫の場合、免疫毒素についての技術はT P-3およびT P-1M o A bを効果的に治療利用するための効力のある方法を提供する。

1. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体（M o A b）は脾リンパ球と骨髓原発性腫瘍の悪性腫瘍細胞（骨髓腫）を融合することで産生される。Milstein、Sci. Am., 243, 66(1980)。この方法では、単一融合細胞ハイブリドーマまたはクローンから生じたハイブリッド細胞系が得られ、これはリンパ球および骨髓腫細胞系の両方の特徴を有する。リンパ球（抗原としてヒツジ赤血球をもつ動物から取得）のように、融合ハイブリッドまたはハイブリドーマは抗原と反応する抗体（免疫グロブリン）を分泌する。さらに、骨髓腫細胞系のように、ハイブリッド細胞系は不死である。特に、ワクチン接種した動物由来の抗血清は、全く同じには再生産できないような様々な抗体の入った混合物であり、一方、ハイブリドーマにより分泌された単一型の免疫グロブリンは、抗原分子構造または抗原決定基（エプトープ）を複数有する複合分子である抗原上に存在する、唯一の抗原決定基に特異的である。このように、単一の抗原から生じたモノクローナル抗体は、形成を促す抗原決定基に依存して互いに異なり得る。しかしながら、一つのクローンにより産生された全ての抗体は同一である。さらに、ハイブリッド細胞系は際限なく再生産し得、in vit

roおよびin vivoで容易に増殖し、極度に高濃度のモノクローナル抗体を産生する。

a. TP-1/TP-3

骨および柔組織の肉腫は一般にまれであるので、その個々の型はさらにまれである。このことが腫瘍特異的なMoAbの発展を妨げているのだけれども、いくつかの進展がみられた。加えて、数種類の肉腫が保持する抗原を認識すると思われる抗体が数多く産生された。肉腫抗原に対するMoAbの大半は開発段階にある。臨床試験に用いる準備のできているものはごくわずかである。

モノクローナル抗体TP-1およびTP-3はヒトおよび犬肉腫上に存在する80 kDの抗原（これをp80抗原と呼んでいる）の異なるエピトープと反応することが分かっている。Bruland等著、『ヒト肉腫に特異的な新しいモノクローナル抗体』、Int. J. Cancer, 38, 27(1986)。特に、TP-3はIgG_{2b}モノクローナル抗体であり、これは骨肉腫ならびに様々な種類の出芽毛細管を含めた間葉性腫瘍を認識する。O.Bruland等著、Cancer Research, 48, 5302(1988)。TP-1およびTP-3はまた血管周囲細胞腫、軟骨肉腫、悪性繊維性組織球腫(MFH)および悪性滑膜腫を含むその他の様々なヒト骨肉腫と結合する。Bruland等著『新しいヒト骨肉腫関連細胞表面抗原の発現および特徴』、Cancer Research, 48, 5302(1988)。

正常組織におけるTP-1/TP-3抗原の分布は大変限定されている。このように組織分布が限定しているので、TP-3抗原を免疫毒素治療に用いることは魅力的である。正常組織および間葉性腫瘍でのTP-1/TP-3の抗原の分布に関する現段階の知識は、最近BrulandおよびPhilにより要約された。『放射免疫検出法および放射免疫法：骨腫瘍の治療における有益な試み』Frontiers of Osteosarcoma Research, J. F. NovakおよびJ. H. McMaster(監修)、HogrefeおよびHuber発行者、pp. 149-159(1993)。陰性組織は繊維芽細胞、抹消血管細胞、骨髓細胞、胎児皮膚繊維芽細胞、胎児肺繊維芽細胞、羊膜細胞、繊維性結合組織細胞、骨格筋細胞、軟骨細胞、滑膜細胞、末梢神経細胞、扁桃細胞、脾臓細胞、肝臓細胞、結腸細胞および肺細胞を含む。新しい活動的な仮骨、胎盤内皮細胞、

腎臓の近位尿細管(弱い結合)および副腎髄質の補助細胞のみが、TP-1およびTP-3結合に陽性である。Bruland等著、Cancer Research, 48, 5302(1988)。

b. その他の担体

TP-1およびTP-3に加えて、他のいくつかの抗体もヒト骨肉腫と反応することが発見され、それ故、本発明においてPAPコンジュゲートとして使用するのに適している。下記の表1参照。数多くのこれらの抗体を用いたin vitroの試験が行なわれているが、この試験はPAPとコンジュゲートしている抗体については行なわれていない。さらに、これらの抗体を用いた骨肉腫に対するin vivoにおける免疫毒素の試験は報告されていない。

表 1. ヒト骨肉腫に反応するモノクローナル抗体

モノクローナル抗体名	抗原の分子量	腫瘍活性グラフ	参考文献
TP-1とTP-3	80,000	骨肉腫	1
		血管周皮細胞腫	1
		出芽腫瘍毛細血管	2
Ost 6,7	86,000	骨肉腫	3
		アルカリホスファターゼ	
791T/36	72,000	骨肉腫	4
		結腸癌、間質	
TM-2	26,000	骨肉腫	5
OS-1	未知	骨肉腫	6
3F8		骨肉腫	7
		黒色腫、神経芽細胞	
OSA-1、OS-2	92,000	骨肉腫	8
2D3、2H10	75,000	骨肉腫	9

1. Bruland 等著、Int. J. Cancer, 38, 27 (1986)
2. Bruland 等著、Cancer Research, 48, 5302 (1988)
3. Hosoi 等著、Cancer Research, 42, 654 (1982)
4. Embelton 等著、Br. J. Cancer, 43, 582 (1981)
5. Tsai 等著、Cancer Research, 50, 152 (1990)
6. Chin 等著、Hybridoma, 5, 339 (1986)
7. Cheung 等著、J. Nat. Cancer Instit., 77, 1175 (1985)
8. Tsang 等著、J. Nat. Cancer Inst., 77, 1175 (1986)
9. Wada 等著、Cancer Research, 48, 2273 (1988)

2. 毒素

様々な研究者が免疫毒素中に用いている数多くの毒素は、2つのグループに大別できる。第1のグループはリチンのような無損傷性毒素からなる。リチンは2つのサブユニットからなり、A鎖は1500個/分ものリボソームを不活性化し得、B鎖は細胞表面の非還元末端のガラクトース残基を認識しA鎖が侵入するのを

助ける。無損傷リチン免疫毒素は標的細胞を大変効果的に破壊するが、B鎖部分の非選択性からin vivoにおける白血病の処置には適用できない。

第2グループの毒素をヘミトキシンという。ヘミトキシンは、真核生物のリボソームに触媒的に作用し60-Sサブユニットを不活性化し、結果としてペプチド伸長の段階で細胞内タンパク質合成を不可逆的に阻害する単鎖リボソーム不活性化タンパク質である。このようなポリペプチド毒素はアメリカヤマゴボウ (*Phytolacca americana*)、苦いひょうたん (*Momordica charantia*)、小麦 (*Triticum vulgare*)、シャボンソウ (*Saponaria officinalis*)、*Gelonium multiflorum* およびいくつかのその他の植物から単離されている。このようなリボソーム不活性化タンパク質は、無損傷リチンと異なり、非選択的細胞結合能力をもつB鎖サブユニットをもっていないため、容易に細胞膜を通過できない。それゆえ、ヘミトキシンは無損傷真核細胞に対して実質上毒性がない。

a. PAP

アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質 (PAP) には3つのサブタイプがあり、その発現は季節に依存する。PAPは春の葉にみられ、PAPIIは残夏の葉にみられ、PAP-Sは種子にみられる。Irvin, *Pharmacol. Ther.* 21, 371 (1983)。大きさ(全て約29,000分子量である)にわずかな差がみられ、触媒的にリボソームを阻害する能力間に差があるとしてもほんのわずかな差である。Houston 等著、『リチンではなく毒素およびヘミトキシンの用いて作られた免疫毒素』、*Immunological Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer*、C. W. Vogel監修、ニューヨーク、オックスフォード大学出版、P. 71 (1987)。

PAPは毒素のヘミトキシングループの一員であり、よって全ての大きいrR

NAの3'末端近傍の保存的ループ配列から一つのアデニンを特異的に除去することによりリボソームを不活性化する。Irvin等著、*Pharmacology and Therapeutics*, 55, 279, (1992)。この特異的な脱プリン化によりリボソームと相互作用する伸長因子の能力が極度に低下し、結果としてタンパク質合成を不可逆的に阻害する。Irvin等著、上記。さらに、PAPは最も活性のあるリボソーム不活性化タンパク質の一つである。抗マウスIgG免疫毒素ゲロニン、リチンA鎖、モモル

ディン、ジアンチン32、サポリンおよびPAPの細胞障害性と比較すると、PAP構成体は試験した中で最も効力のある免疫毒素の一つであった。Bolognesi等著、『異なるリボソーム不活性化タンパク質および抗体を含む抗リンパ球免疫毒素の比較』、Clin. Exp. Immunol. 89, 341(1992)。

3. 生物療法剤

本発明の生物療法剤は、一般的に上記に開示した毒素のような細胞障害性薬剤を特定の標的細胞または器官に細胞障害性薬剤を運搬できるような担体と結合させた化合物と定義し得る。このように、本発明の生物療法剤は、上記に定義した免疫毒素だけでなく、例えば組換えタンパク質のような遺伝子工学の既知方法により合成された構築物も含み得る。これらの生物療法剤の活性は、使用する毒素のみならず、抗体の抗原への効率的な結合、エンドサイトーシスおよび機能性リボソーム不活性化タンパク質の細胞内放出にも依存している。例えば、TP-3-PAPは、間充組織腫瘍を認識するIgG_{2b}モノクローナル抗体であり、共有結合的にリボソーム阻害植物毒素PAPに結合しているモノクローナル抗体TP-3から構成されている。細胞内の数個のPAP分子で十分に細胞を殺戦できるほどの効力をPAPは有しているので、この特定の免疫毒素の究極的な有効性および治療係数を決定するにあたりTP-3抗原濃度は結合の特異性よりも重要ではない。Vitetta等著、『免疫毒素』：Biologic Therapy of Cancer、V.T.DeVita, Jr.、S.Hellman、S.A.Rosenberg(監修)、J.B.Lippincott Company、pp. 482-495(1991)。さらに、このPAP免疫毒素に独特であると思われるTP-3-PAPの予期しない効力は、より少ない免疫毒素の投与を可能とし、これは治療面での利点である。

4. 生物療法剤の生産および精製

好ましい生物療法剤は、細胞障害性有効量のPAP分子をTP-1またはTP-3の各々の分子に結合することにより形成される。例えば、本発明の実践に有益な薬剤は1分子のTP-3に対して1~3分子のPAP分子をもつTP-3-PAPの混合物である。

モノクローナル抗体-PAP免疫毒素の形成において有益なヘテロ二重機能性

架橋剤は、SPDP（N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸）およびその誘導体を含む。例えば、下記の実施例で用いた特定のTP-3-PAPは、架橋剤であるSPDPでTP-3 MoAbを修飾し、次いで修飾したTP-3を3.5:1モル数で過剰の2-イミノチラン修飾PAPと反応させて調製する。

5. 生物療法剤の投与方法

本発明の生物療法剤は医薬組成物として形成せしめ、ヒト患者のようなホ乳動物宿主に、静脈注射、筋肉内注射または皮下注射から選択した非経口投与に適合する様々な形で投与し得る。

a. 用法形態

本発明の生物療法剤は、非経口投与、すなわち、注射または点滴による静脈投与または皮下投与が好ましい。生物療法剤の溶液または懸濁液は、水またはPBSのような等張食塩水中で調製し得、所望により無毒性界面活性剤を混合し得る。分散液もまたグリセロール、液体ポリエチレングリコール、DMA、植物油、トリアセチンおよびそれらの混合物中で調製し得る。通常の貯蔵および使用条件下で、これらの調製物は微生物の増殖を防ぐために保存剤を含み得る。肉腫はしばしば肺に転移するので、療法剤の肺へのより特異的な運搬はエアゾール運搬系を用いて行い得る。エアゾール運搬に適する薬剤用法形態は適当なサイズのリポソームのような製剤を含み得る。

注射または点滴使用に適する薬剤用法形態には、無菌の注射または点滴溶液または分散液に適する活性成分を含有する無菌水溶液または懸濁液、または無菌粉末などがある。全ての場において、最終の用法形態は、無菌であり、液体であり、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない。液体担体または賦形剤

は、例えば水、エタノール、多価アルコール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、無毒性グリセリルエステル、脂質（例えばジミリストイルホスファチジルコリン）および適当なそれらの混合物からなる溶媒または液体拡散媒質であり得る。適当な流動性は、例えばリポソームの形成、拡散の場合に必要な粒子サイズの維持または無毒性な界面活性剤の使用などにより維持できる。微生物の活動は、様々な抗菌剤

および抗真菌菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チペロース等により防御し得る。多くの場合において、例えば糖、緩衝液または塩化ナトリウムのような等張剤を含むことが望ましい。注射可能な組成物吸収の延長効果は、例えばアルミニウムモノステアリン酸ヒドロゲルおよびゲラチンのような吸収を遅める薬剤を組成物中に含有することにより達成し得る。

無菌の注射可能なまたは点滴可能な溶液は、必要量の生物療法剤を適当な溶媒中に、上記に記載した様々なその他の成分とともに取り込み、ついで必要により無菌濾過することで調製される。無菌注射または点滴溶液の調製用の無菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これにより活性成分の粉末と所望により添加した成分が前記の無菌濾過溶液中に存在するものが生じる。

b. 用量

上記成分中の生物療法剤の用量は、患者の体重、年齢および状態と標的癌の状況により大きく変化する。動物実験に基づくと、用量は約1〜7日間にわたって投与したとき0.025mg/kgから1mg/kgの間で変化することが予想される。

本発明は次の詳細な実施例を参照することでより詳細に説明される。本発明において、OHS系はTP1/3抗原の構造的発現を有する粘着性ヒト骨肉腫である。OHSは、網膜芽細胞腫から13年後におこった転移性骨肉腫の若者からFostad等によりもたらされた(『左右対象網膜芽細胞腫の処置13年後に現れた多骨肉腫をもつ患者から確立された細胞系の特徴』、*Int. J. Cancer*, 38, 33(1986))。本研究では、OHSは、Dr. Deborah Haines (Western College of Veterinary Medicine, Saskatoon, カナダ) から得られ、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシ

リン、100mcg/mlストレプトマイシンおよび10% FCSと共にRPMI 1640中を通過させた。D17(犬骨肉腫)はDr. Stuart Helhfand(ウィスコンシン大学、マジソン ウィスコンシン)から得られた；D17はTP-3抗原に対して陰性である。ヒトCD19+異質急性リンパ性白血病細胞系、RS4;11はDr. John Kersey (ミネソタ大学、ミネアポリス ミネソタ) から得られ、TP-3-PAP研究の陰性対照系として用いた。

実施例1：TP-3 MoAb産生および精製

TP-3 MoAbハイブリドーマを、Fostad等（『複合網膜芽細胞腫に対する処置の13年後に現れた多骨肉腫をもつ患者から確立された細胞系の特徴』、Int. J. Cancer, 38, 33(1986)）が記載しているように、ヒト骨肉腫異種移植片に対するBALB/cマウスの免疫感作から得た。簡潔にいうと、TP-3ハイブリドーマ細胞を25mM HEPES、2mM L-グルタミン、100U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、10mM非必須アミノ酸、100mMピルビン酸ナトリウムおよび10%ウシ胎仔血清（FCS; Sigma、セントルイス ミズーリ）を含有するDMEM(Celox、ホプキンズ ミネソタ)中で培養した。BALB/cマウスに、TP-3ハイブリドーマ細胞 2×10^6 個を腹腔投与する7日前にプリスタン(Aldrich Chemical Co.、ミルウォーキー ウィスコンシン) 0.5mlを腹腔投与(i.p.)で注入した。TP-3 MoAbを含む腹水を集め12,000g \times 20分で遠心し、合わせ、0.22 μ m濾紙に通して濾過した。TP-3 MoAbは硫酸沈澱法およびタンパク質Aアガロース(Immunopure Plus immobilized protein A: Pierce、ロックフォード イリノイ)を用いてさらに精製した。タンパク質Aからの溶出はイムノビュア溶離液(Immunopure elution buffer) (Pierce)を用いて行った。TP-3はリン酸緩衝液に対して透析し、使用前に無菌濾過した。

実施例2：TP-3-PAP免疫毒素合成

TP-3 MoAbは上記実施例1に記載のように精製し、一方PAPは以前にIrvine等が記載したように出発物質としてアメリカヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) の春の葉を用いて精製した。(『アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパ

ク質：リボソームの不活性化および治療適用』、Pharmac. Ther., 55, 279(1992))。

リン酸緩衝液中8mg/mLの濃度の精製TP-3 MoAbを、DMSO中で新しく調製し、使用直前にPBS中で1:10に希釈したSPDP(N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸(ファルマシア、Biotech Inc.、Piscataway、ニュージャージー)の過剰量と3.5:1のモル比で反応させた。精製し、リン酸緩衝液に対して透析したpH8.0のPAPを10mg/mLまで濃縮し、使用直前に50mMリ

ン酸ナトリウム、pH8.6中で調製した2-イミノチオラン HCl (Pierce、ロックフォード、イリノイ) の過剰量と3.5:1モル比で混合した。どちらの修飾方法も無菌および発熱物質のないガラスのバイアル内でゆるやかに振盪しながら室温で1.5時間反応させた。

過剰の架橋剤を、PBS中で平衡化したprepacked Sephadex G-25 PD-10カラム(ファルマシア、Biotech Inc.、Piscataway、ニュージャージー)に通過させることで除去した。画分を280nmで測定しタンパク質の大半を含む画分を合わせ、MoAbおよびPAPの全量をそれぞれMoAbおよびPAPの E_{280nm} (1%)値1.43および0.83を用いてそれぞれ決定した。チオール化したPAPを、最終モル比PAP:MoAb 3.5:1となるようにSPDP-修飾MoAbに加えた。混合物を室温で3時間穏やかに振盪し、一晚4℃でインキュベートし、HPLC精製段階の調製用に濾過する前に更に3時間室温で振盪した。

未反応のPAPおよび高分子量($\geq 300kd$)免疫コンジュゲート/集合体を取り除くためにpH6.8の100mMリン酸ナトリウム中、流速3mL/minで平衡化した21.5×600 mm Spherogel TSK3000SW HPLCカラム(Beckman Instruments and TosoHaas)を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行なった。コンジュゲートを形成していないTP-3 MoAbをイオン交換クロマトグラフィーを用いてHPLC-精製TP-3-PAP免疫毒素調製物から除去した。HPLC分画を濃縮し、一晚4℃でpH7.1の10mMリン酸ナトリウムに対して透析した。透析したTP-3-PAPのpHおよび導電率は、初めにpH6.5の10mMリン酸ナトリウム中で平衡化したCM-セファロースレジンに合わせた。CM-セファロースカラムは簡単にpH7.1の10mMリン酸ナトリウムで洗浄し; T

P-3 MoAbを20mM塩化ナトリウムを含むpH7.8の10mMリン酸ナトリウム中で溶出し、TP-3-PAP免疫毒素を溶離液であるpH7.5のリン酸緩衝液で回収した。図1に示したように、TP-3-PAP免疫毒素は注入から約34分後に溶出し始め、続いて近接して未反応TP-3 MoAbが溶出した。遊離型PAPは56分に溶出し、これは免疫毒素からよく分離していた。HPLC半-精製物質はまだかなりの量の未反応TP-3 MoAbを含んでいた。

精製方法はSDS-PAGEで5%分離ゲルを用いて調べた。乾燥ゲルのSDS-PAGEの走査によると、最終TP-3-PAP免疫毒素調製物中には<5%のPAPが存在することが分かり、これはまた、MoAb (150kd)が14%、1個のMoAb分子に1個のPAP分子がジスルフィド結合している180kd種が34%、1個のMoAb分子に2個のPAP分子が結合している210kd種が34%および各MoAb分子に3個のPAP分子が結合している240kd種18%を含んでいた(図1)。クーマシーブルー染色ゲルを乾燥させ、ベックマンDU62分光光度計およびゲルスキャンソフトパックモジュールソフトウェア (GelScan Soft-Pac Module software) を用いて走査した。タンパク質濃度をビスニコニン酸検定システム(Bicinchoninic acid assay system) (Sigma)を用いて測定した。加えて、Bio-Rad研究所から得られたシルバーステインキット (silver stain kit) を用いてSDS-PAGE後のタンパク質のバンドをより感度よく検知し視覚化した。

TP-3-PAP免疫毒素中のTP-3モノクローナル抗体およびPAP部分の存在ならびに精製TP-3-PAP免疫毒素中の有意な量の遊離型PAPによる汚染がないことをウエスタンブロット解析(図1C)および上記に記載したように、以前にMyers等が記載したようにBio-Rad研究所から得られた検知キットを用いて確認した。抗PAP原発性抗体は高純度のPAPを用いて過剰免疫したウサギ中で産生した。またイムノブロッティングをアルカリホスファターゼーコンジュゲート・ヤギ抗-マウスIgG (Sigma Chemical Co.、セントルイス、ミズーリ)を用いて、上記に記載のように、以前にMyers等が報告しているように、精製免疫コンジュゲート調製物中に残存する非コンジュゲート抗-TP-3モノクロー

ナル抗体を検知した。タンパク質濃度はSigmaのビスニコニン酸検定システムを用いて決定した。

実施例3：ヒトOHS骨肉腫細胞に対するTP-3-PAP免疫毒素活性

標準的な³Hチミジン取り込み解析を用いて、MoAb、毒素および免疫毒素の溶液のOHS細胞成長に対する効果について試験を行なった。

サンプルと指示薬OHS細胞を2~4日間インキュベートした後、³Hチミジン(デュボンNEN、ボストン マサチューセッツ) 25μl (2μCi) を、濾過

紙ディスク上にDNAを接種する前に6時間インキュベートした各穴およびプレートにPHD細胞接種装置 (Cambridge Technology, Inc., ウォータータウン、ミネソタ) を用いて加える。液体シンチレーション流体 (Cytoscint; ICN, Costa Mesa カリフォルニア) を添加後、LKB1216液体シンチレーションカウンタを用いて決定した。データはDr. Bob Jarvis (University of Minnesota Computer Sciences) が執筆したExcel macro routineを用いて解析し、各サンプルの3セットの平均および標準偏差を決定した。Clonogenic Assayは以前にUckun等により報告された方法を用いてOHSで行なった。(『共通B-列急性リンパ芽球白血病の患者から新しく得られた芽原種細胞に対するアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質を含む免疫毒素の細胞障害性を評価するための新規コロニー解析の使用』、*J. Exp. Med.*、163, 347(1986))。

TP-3-PAP免疫毒素は効果的にTP-3+OHS骨肉腫細胞を殺滅することが示された。例えば、図2はTP-3 MoAb、TP-3-PAP、PAPのみおよびB細胞 (B43-PAP) 上に存在するCD19に結合する関連免疫毒素構築物の、ヒトOHS骨肉腫細胞の増殖に対する効果を示している。TP-3 MoAbのみ (すなわちPAP毒素なしで) では増殖に対して何の効果もなく；細胞は³Hチミジンをヒト血清アルブミン(HSA；図2A)をもつ媒体と同じような方法でDNA中に取りこんだ。TP-3-PAPは、しかしながらOHS細胞をもつ最初の4穴で³Hチミジンの取り込みを完全に阻害した；OHSはTP-3-PAPが20 pMまたはそれ以下に希釈されるまで免疫毒素処置に耐えられなかった。さらに、異なるロットのTP-3-PAPは再現性のあるOHSの高度殺滅能を有

する。ロット1のTP-3-PAPをもつ5つの独立した実験におけるOHSを用いた³Hチミジン増殖解析では、平均IC₅₀値が3.1±1.0 pMであった。第2のロットのTP-3-PAPを用いた3つの異なる実験では平均IC₅₀値が4.1±0.3 pMであった。全体の平均IC₅₀は3.5±1.0 pMであった。

これらの結果は、TP-3-PAPによる細胞の殺滅がTP-3抗原を発現する細胞に対して高度に特異的であるということを示している。PAPのみまたは抗-CD19免疫毒素であるB43-PAPは、濃度が10,000 pMまたはそれ以上になる

までOHS増殖に対して全く効果がなかった（図2B参照）。これは、もしTP-3-MoAbがPAP部位にコンジュゲートしていれば細胞障害性が>3,000倍増加することを示している。もし腫瘍がTP-3抗原を発現していなかったのならば、TP-3-PAPによる殺滅は $<10^4$ pMの濃度ではおこななかった（図3Aおよび3B）。しかしながらB43-PAPはCD19+細胞系RS4;11に対して活性があった（図3B）。このように、PAP免疫コンジュゲートによる殺滅は特異的なMoAb結合によりもたらされた。

高感度のin vitro連続希釈clonogenic assay systemを用いてclonogenic OHSヒト骨肉腫細胞に対するTP-3-PAP免疫毒素のlog殺滅効力を決定した。下記の表2に示されるように、37°C/5%CO₂で100-3000ng/mLのTP-3-PAPで4時間処置するとclonogenic OHS細胞を用量依存的に1000ng/mL (5.6nM)において最大 3.9 ± 0.2 のlog値で殺滅した。特筆すべきことに、濃度 ≤ 100 ng/mLのTP-3-PAPで4時間処理する実験法ではOHS細胞のclonogenic成長をたいして阻害しなかった(log殺滅 ≤ 0.2 log値)。対照的に、1ng/mL \sim 3000ng/mLのTP-3-PAPに18時間さらすと用量依存的にclonogenic細胞を殺滅し、100ng/mL濃度では1.2のlog殺滅値、濃度 ≥ 300 ng/mLでは >3.9 のlog殺滅であった（表2）。

表 2. Clonogenic 骨肉腫細胞に対する TP-3-PAP の抗腫瘍活性

(OHS ヒト骨肉腫 Clonogenic 解析)

インキュベーション 時間 (h r)	TP-3-PAP 濃度 (ng/ml)	コロニー単位 (平均±偏差)	Log 殺滅 (平均±偏差)
4	0	4588±1556	0.00±0.00
4	10	4588±1556	0.00±0.20
4	30	2683±910	0.23±0.20
4	100	2683±910	0.23±0.20
4	300	313±135	1.16±0.23
4	1000	4±1	3.91±0.23
4	3000	4±1	3.91±0.23
18	0	4588±1556	0.00±0.00
18	1	2052±550	0.34±0.22
18	10	917±311	0.69±0.20
18	30	313±321	0.58±0.18
18	100	120±135	1.06±0.23
18	300	62±27	1.86±0.23
18	1000	4±1	3.91±0.23
18	3000	4±1	3.91±0.23

実施例 4. TP-3-PAP の in vivo 投与

N I H のガイドラインに従いマウスをミネソタ大学 Research Animal Resources が飼育した。生動物を含む方法および実験法はミネソタ大学 Animal Care Committee により承認された。p80 抗原 (TP-3 抗原) 陽性 M C A 106 柔組織骨肉腫は Dr. Jim Mule (N C I、Bethesda メリーランド) から得、雌 C57 B L/6 マウスに順次通過させた。腫瘍を切り取り、細かく切り、100u/ml のペニシリン、100ucg/ml のストレプトマイシンおよび 2mM L-グルタミンと共に R P M I 1640 中で 0.4mg/ml ヒアルロニダーゼ、0.05mg/ml デオキシリボヌクレアーゼおよび 4.0mg/ml コラゲナーゼ (Sigma) を用いて 4 時間マグネチック攪拌プレート上で攪拌し消化した。細胞を Cell Strainers™ (Falcon、Becton Dickinson) を通して濾過し、Ca²⁺ または Mg²⁺ のないハンクスの平衡塩類溶液 (Hank's Balanced Salt Solution) (HBSS) で 3 回洗浄し、濃度を 1×10⁵ 細胞/ml に合わせた。肺

転移は、MC A106骨肉腫細胞（40,000細胞/マウスを含有する0.4cc）を6～8週の雌C57BL/6マウスの尾の静脈に静脈内注射することで確立した。

肺転移をもつ10匹のマウスのグループに抗体のみまたは免疫毒素調製物を腹膜投与で処置した。転移数を転移確立14日後に直接数えることで評価した。CO₂で窒息させた後、India ink（5% 3gtt NH₄OH/100ml）を気管に注入した。肺および心臓は塊で除去し、Fekete's溶液（70%エタノール300ml、10%ホルマリン30mlおよび氷酢酸15ml）の中に入れる。肺は少なくとも二重盲検法により記録し計測した。処置グループ間の転移の数における相違はStudentの非対t-検定（InstatTM、GraphPad Software、サンディエゴ、カリフォルニア）を用いて評価した。

TP-3-PAPはin vivoにおいて肺転移に対して活性があることが分かった。下記の表3および図4はMC A106肺転移をもつマウス中でTP-3-PAPを用いたときの結果を要約している。TP-3 MoAbのみでも関連するB43-PAP免疫毒素でも肺転移の数に対する効果は全くなかった（表3）。しかしながら、3日間連続でTP-3-PAPを腹膜投与した免疫毒素処置では肺転移数を劇的に減少させることができた（ $p < 0.04$ ）。第二の実験で用量反応相関を調べた（図4）。TP-3-PAPによる肺転移の減少は用量相関的であり、試験用量が非常に重要であった（表3）。興味深いことに、TP-3-PAP処置したマウスでみられた転移数が極めて少ないだけでなく、TP-3-PAP処置マウスの肺転移のサイズも対照のマウスの転移に比較してずっと小さかった。有意な抗腫瘍効果に必要なとされるTP-3-PAPの蓄積量は3.75 μ gおよび30 μ g/マウス（0.2～1.5mg/kg）の間であった。

表3

TP-3-PAP後の肺転移の減少と関連免疫毒素 B43-PAP
またはTP-3 MABのみの無効果

処置 ^b	免疫毒素 ^c の用量	肺転移の数 ^a		studentの
		平均	偏差	t-検定 p 値 ^d
HBSS(対照)	なし	10.2	2.5
TP-3 MAB	0.0	16.4	2.8	NS
TP-3-PAP	1.1	5.2	1.7	NS
TP-3-PAP	3.3	2.2	4.2	0.047
TP-3-PAP	10.0	0.75	0.75	0.039
B43-PAP	10.0	6.5	2.8	NS

^a14 日目に計測した転移数

^bMCA 106 肉腫はB43-PAP免疫毒素により認識されるCD19エピトープを全くもたない；しかしながらMCA106 腫瘍はTP-3 MABと交差反応する

^c3, 4, 5 日目の1日あたりのマイクログラム数

^d対照グループとの比較

実施例5：ヒト骨肉腫のSCIDマウスモデルにおけるTP-3-PAPに関する研究

SCIDマウスの異種移植モデルにおけるヒト骨肉腫に対するTP-3-PAP免疫毒素のin vivoにおける抗腫瘍効力は以下のように調べた。C. B. -17-SCIDマウスにOHS細胞 1×10^6 個を右後足に皮下接種した。右後足に腫瘍細胞を皮下接種した2時間後に、3日間続けてTP-3-PAPの腹腔投与による処置を開始した。未処置のマウスの大半は17日までにOHS足腫瘍ができ、25日までに未処置マウスの100%に平均容積 137mm^3 の足腫瘍ができた。腫瘍容積は図5に示す。

用量レベルが5, 10または $20\mu\text{g}$ /マウスのTP-3-PAPによって、SCIDマウス中のOHS足腫瘍の発現および進行が大幅に遅延した。TP-3-PAP $20\mu\text{g}$ で処置したSCIDマウスはどれも、接種から110日まで足の腫瘍ができなかった。最も重要なことは、これは生存の改善に関連しているということである。図6参照。さらに、TP-3-PAPは大きな腫瘍の急速な壊死をもたらした。対

照的に、非コンジュゲートTP-3抗体、非コンジュゲートPAPまたはB43-P

A P（対照の白血球細胞指向の免疫毒素）の混合物はこのモデル系では抗腫瘍活性を全くもたなかった。これらの実験によれば、T P-3-P A P免疫毒素はin vi voにおいてヒト骨肉腫移植片に対する顕著な抗腫瘍活性を示し、他の極めて多くのヒトO H S骨肉腫細胞にかかったS C I Dマウスの腫瘍の発現しない期間を改善する。

参考文献として個々に挙げているが、全ての出版物、特許および特許文献がここで参考文献として合体する。この発明は特定および好ましい態様および技術に関して記載されている。しかしながら、本発明の精神および範囲内において多くの変法や修飾をなし得ることを理解されたい。

FIG. 1A

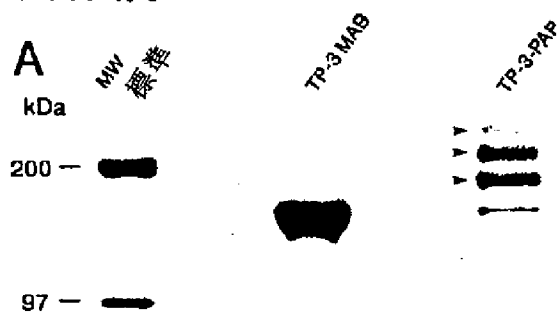


FIG. 1B

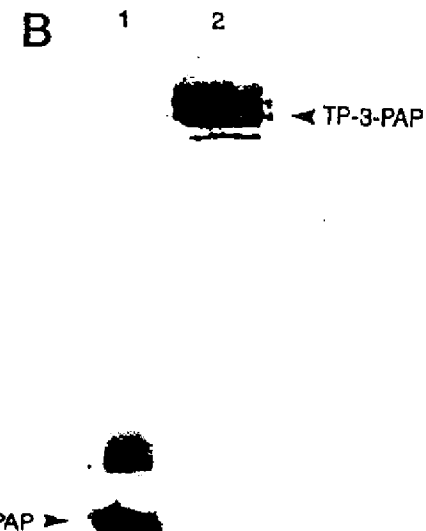
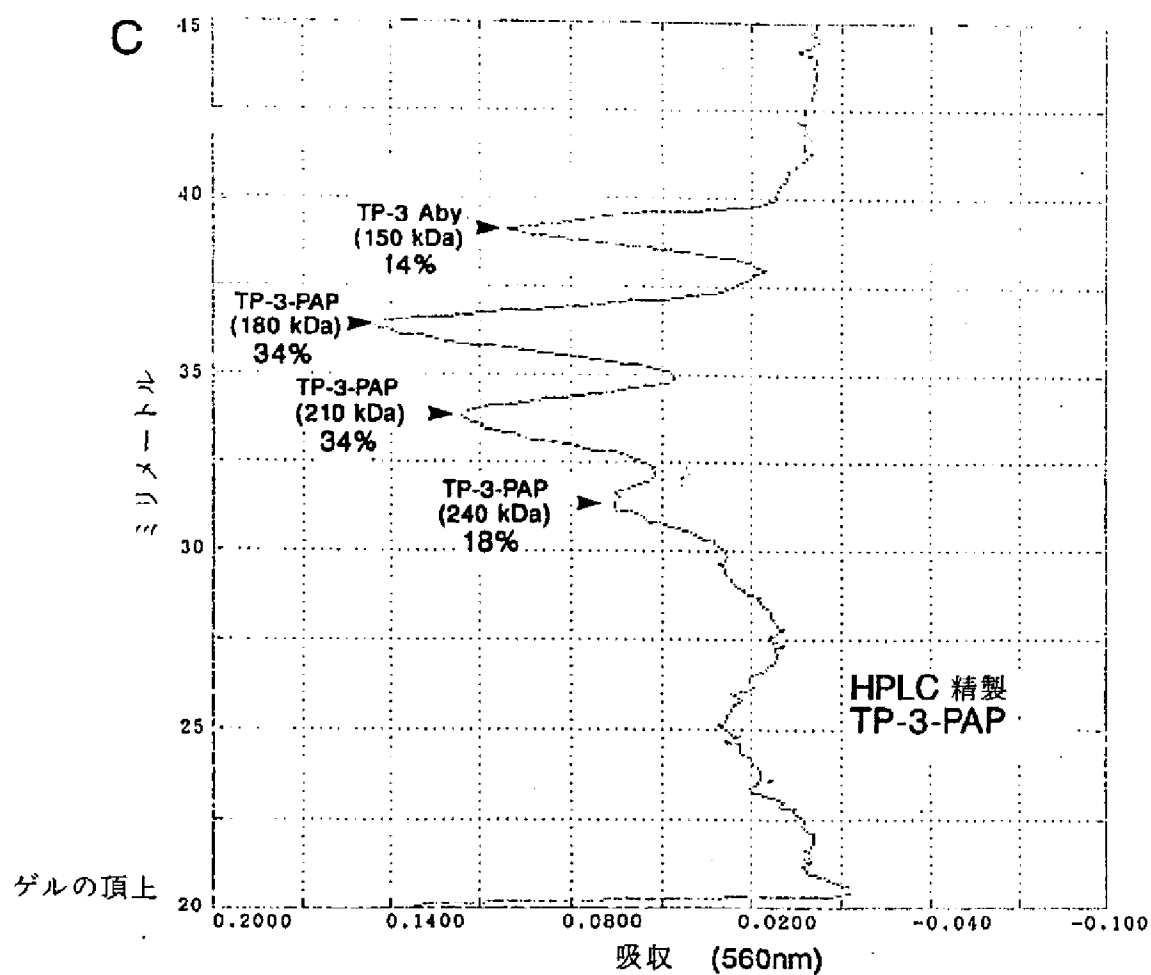


FIG. 1C



【図2】

FIG. 2A

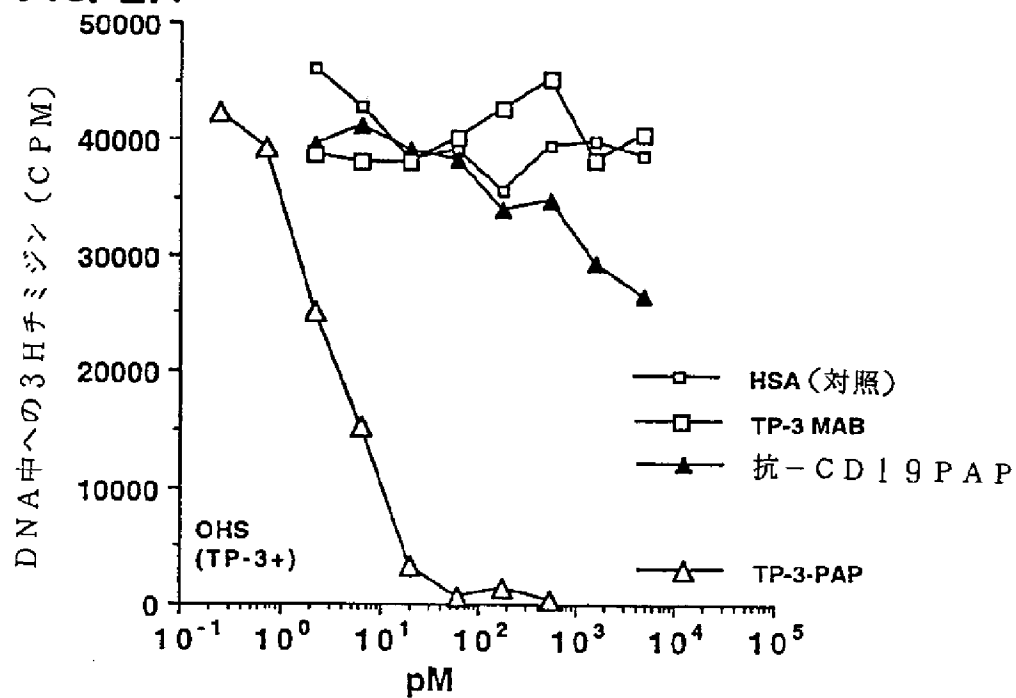


FIG. 2B

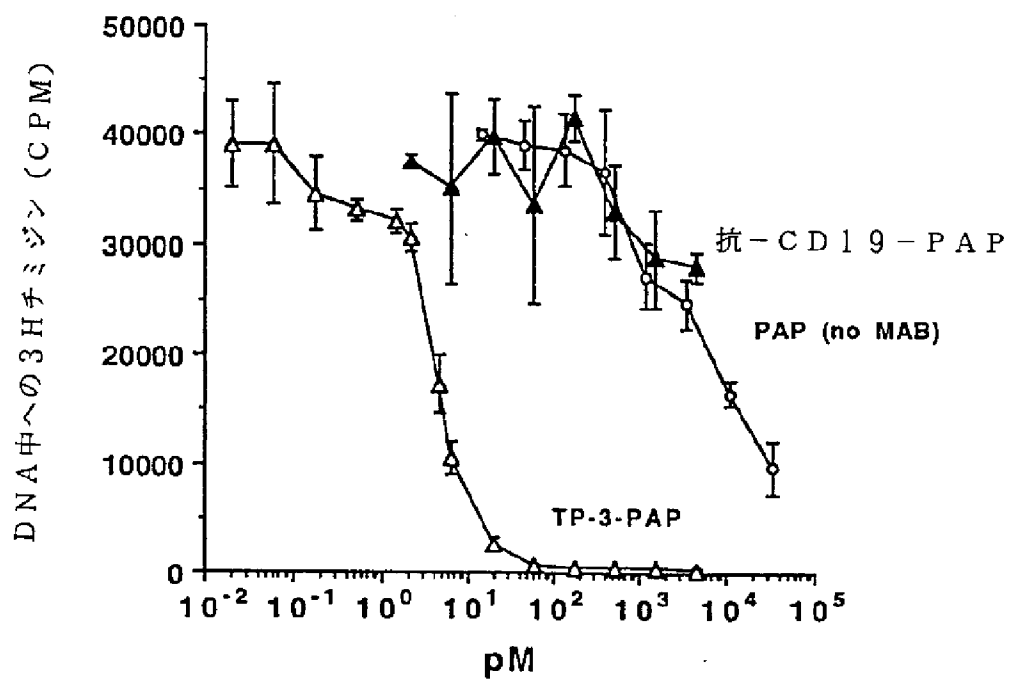


FIG. 3A

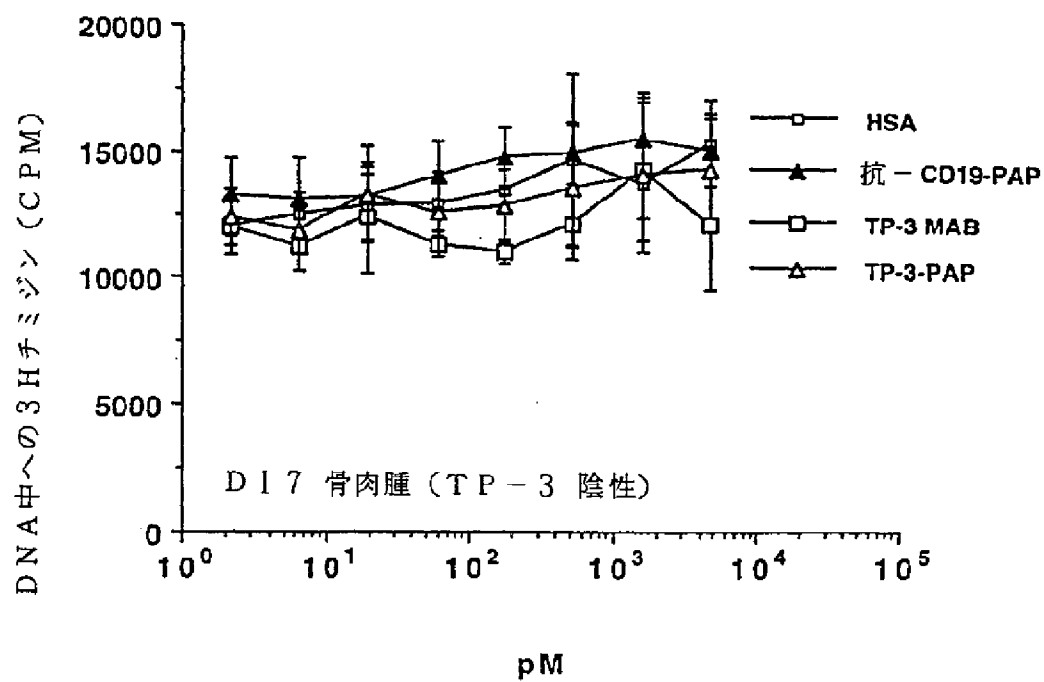
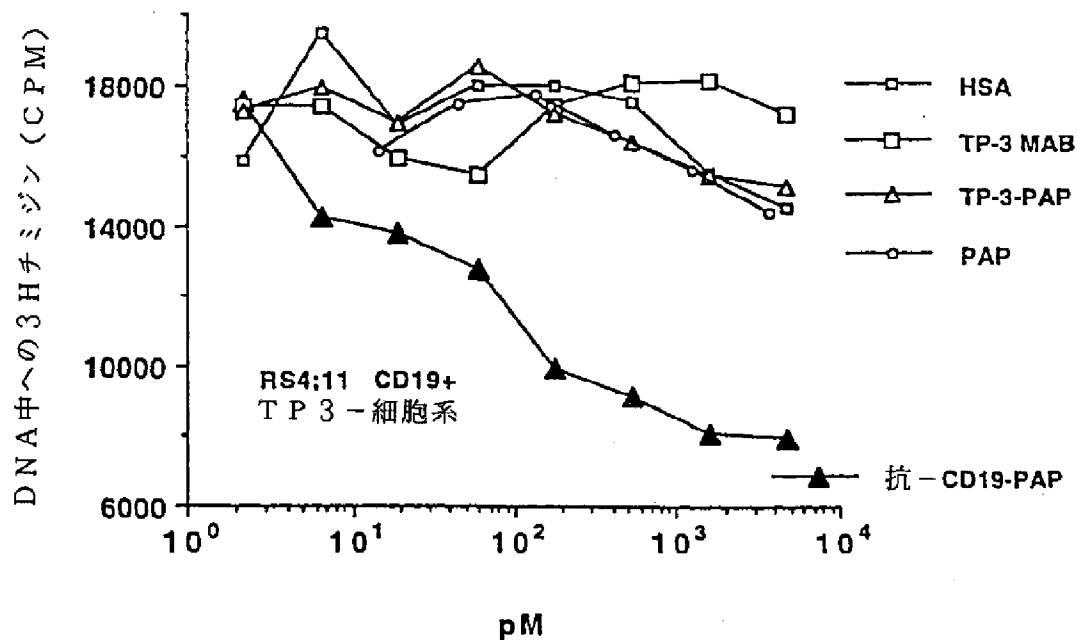


FIG. 3B



【図4】

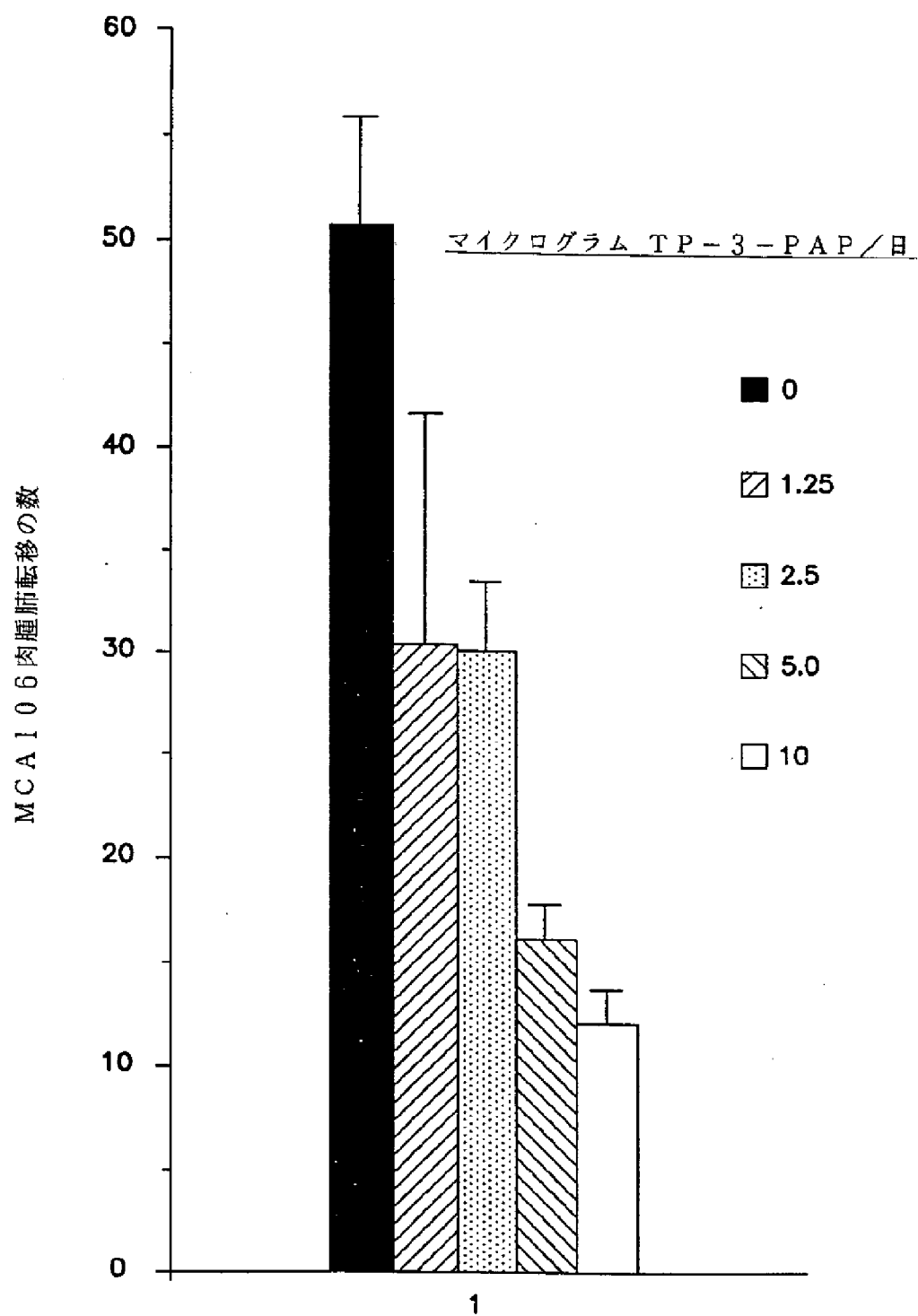


FIG. 4

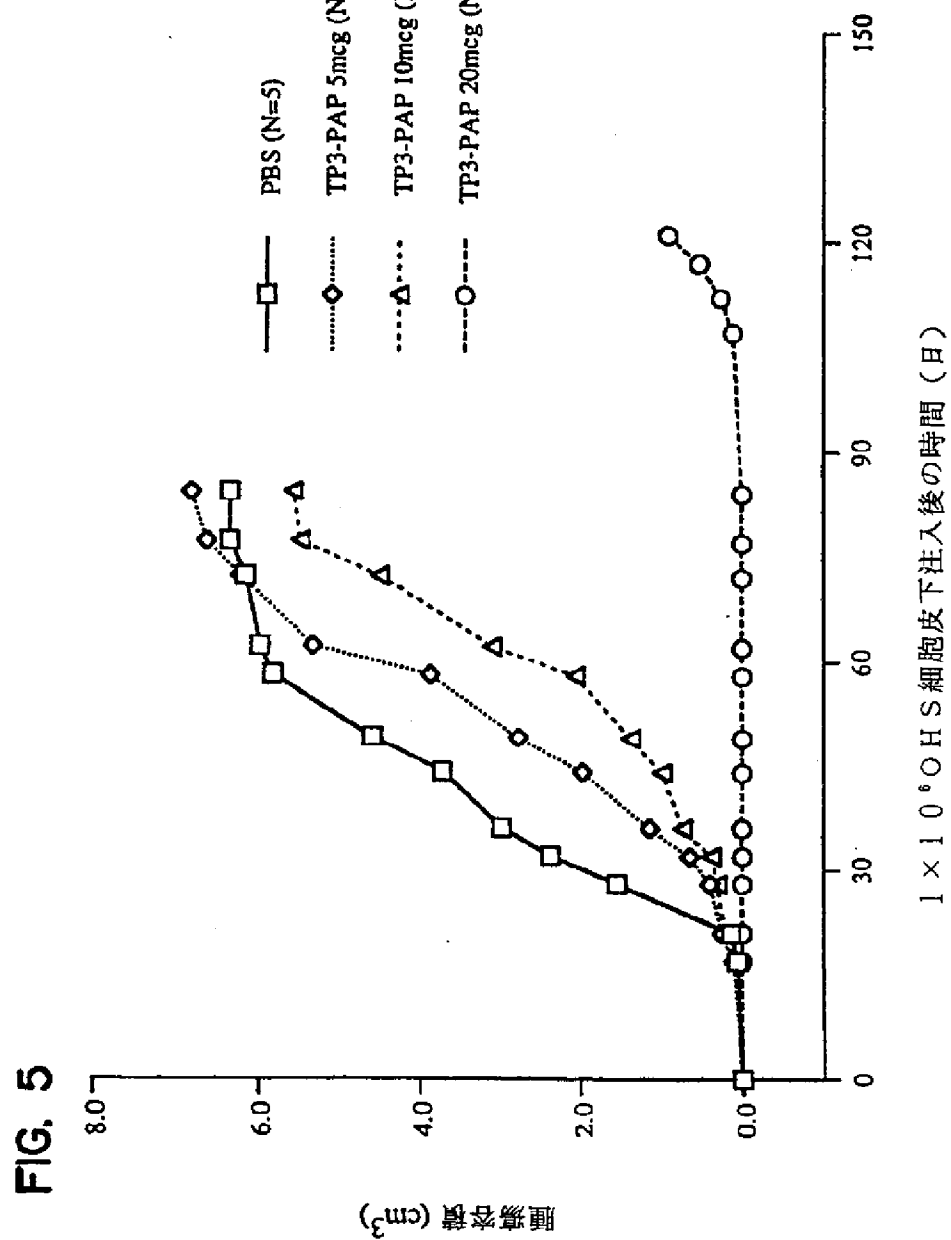
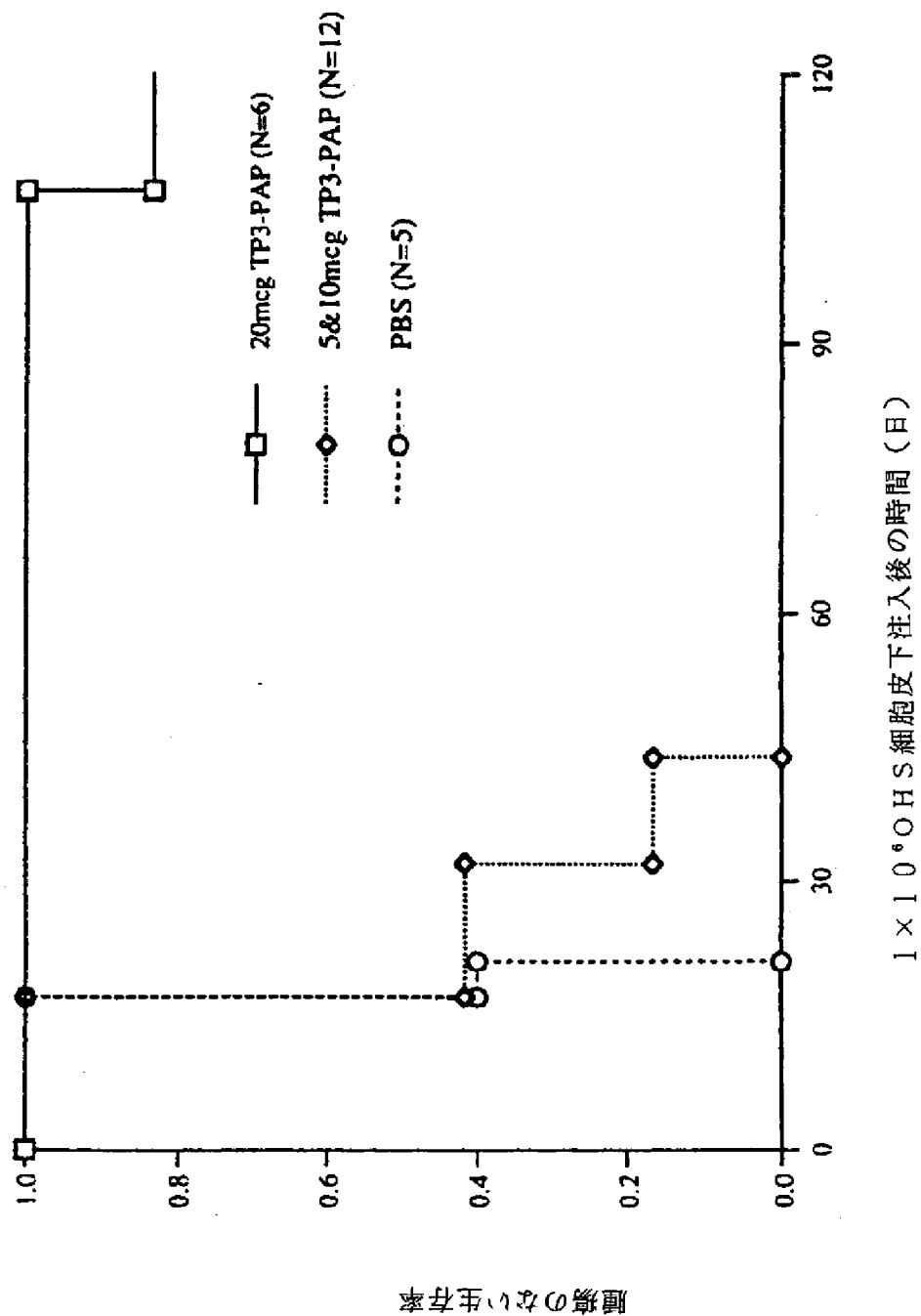


FIG. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 96/00104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K47/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 831 117 (UCKUN FATIH M) 16 May 1989 see column 8, line 16 - line 62	1-19
P,X	--- CANCER RES. (1995), 55(6), 1321-7 CODEN: CNREA8;ISSN: 0008-5472, 1995, XP002002853 ANDERSON, PETER M. ET AL: "In vitro and in vivo cytotoxicity of an anti-osteosarcoma immunotoxin containing pokeweed antiviral protein" see page 1323, column 2, paragraph 2 --- -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 May 1996		Date of mailing of the international search report 24/05/96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tk. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Berte, M

Form PCT/ISA/218 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 96/00104

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE EMBASE ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL AN=78316627, XP002002855 see abstract & CANCER, vol. 41, no. 3, 1978, PHILADELPHIA, pages 814-819, ROTH J.A. ET AL.: "EFFECT OF ADRIAMYCIN AND HIGH DOSE METHOTREXATE CHEMOTHERAPY ON IN VIVO AND IN VITRO CELL MEDIATED IMMUNITY IN CANCER PATIENTS."</p> <p>---</p>	1-19
X	<p>WO,A,93 23062 (IMMUNOMEDICS INC) 25 November 1993</p>	1
Y	<p>see claims 1,7,19</p> <p>---</p>	1-19
P,X	<p>ANTICANCER RESEARCH & ABSTRACTS OF THE FIFTH INTERNAT. CONFERENCE OF ANTICANCER RESEARCH , vol. 15, no. 5A, September 1995 - October 1995, (CORFU, GREECE), pages 1794-1795, XP002002854 P.M. ANDERSON ET AL.: "TP-3 ANTIBODY-POKEWEED ANTIVIRAL PROTEIN (TP-3-PAP) CONJUGATE EFFICIENTLY KILLS OSTEOSARCOMA." see the whole document</p> <p>---</p>	1-16
X	<p>DATABASE EMBASE ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL AN=86051187, XP002002856 see abstract & DRUGS TODAY, vol. 21, no. 11, 1985, pages 511-521, GELLEGO J. ET AL.: "MONOCLONAL ANTIBODY-DRUG CONJUGATES: A NEW APPROACH FOR CANCER THERAPY"</p> <p>-----</p>	1,2

Form PCT-ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US96/00104

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark Although claims 6-19 are directed to a method of treatment of
(diagnostic method practised on) the human/animal body, the search has been
carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT.

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 96/00104

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4831117	16-05-89	NONE	
WO-A-9323062	25-11-93	EP-A- 0651646 JP-T- 8500084	10-05-95 09-01-96

Form PCT/ISA/218 (patent family annex) (July 1992)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AZ, BY, KZ, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN

(72)発明者 アンダーソン, ピーター・エム

アメリカ合衆国55426ミネソタ州セント・ルイス・パーク、ルイジアナ・アベニュー
2809番